

大川芎方HPLC指纹图谱方法学研究

沈伟¹,张一文¹,李赫宇²

(1. 山东中医药高等专科学校,山东 烟台 264199;2. 天津市益倍建生物技术有限公司,天津 300457)

摘要:建立大川芎方 HPLC 指纹图谱方法学。考察色谱条件,选择合适的分析波长,考察方法的精密度、重现性、稳定性等。结果表明:色谱柱:Hypersil ODS2 C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)反相色谱柱,流动相甲醇-1%醋酸梯度洗脱:0 min→35 min,A:5%→35%;35 min→50 min,A:35%→80%;50 min→60 min,A:80%→80%;60 min→65 min,A:80%→5%;柱温:30℃;流速:1 mL/min;检测波长270 nm。在上述条件下,所建立方法的精密度、重现性、稳定性等良好。所建立的大川芎方 HPLC 指纹图谱方法学为该方的定性、定量分析提供了新方法。

关键词:大川芎方;高效液相色谱;指纹图谱

The HPLC Fingerprint Analysis of Dachuanxiong Formula

SHEN Wei¹, ZHANG Yi-wen¹, LI He-yu²

(1. Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264199, Shandong, China;

2. Tianjin Ubasichealth Nutrition Co. Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: To develop HPLC chromatographic fingerprint for Dachuanxiong formula. The chromatographic conditions were investigated, the proper analytical wavelength was inspected, and the precision, reproducibility and stability were determined. Chromatographic conditions: A Hypersil ODS2 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was applied with the gradient elution solvent system composing of methanol (A) and 1% acetic acid water (B): 0 min→35 min, A:5%→35%;35 min→50 min, A:35%→80%;50 min→60 min, A:80%→80%;60 min→65 min, A:80%→5%. The column temperature was 30 ℃ and the flow rate was 1 mL/min. The signal was acquired at 270 nm. Under the conditions we investigated, the precision, reproducibility and stability of the HPLC chromatographic fingerprint method were good. The HPLC chromatographic fingerprint method established in this paper applied a new method for qualitative and quantitative for Dachuanxiong formula.

Key words: Dachuanxiong formula; HPLC; fingerprint

大川芎方源于金·刘完素《宣明论方》,由川芎、天麻两味药组成。川芎,又名大川芎,为伞形科多年生草本植物川芎的根茎,为四川特产药材,性味辛温,有活血行气,祛风止痛之功,诸多月经不调、痛经、头痛等的药膳中多用川芎。天麻具有对神经细胞损伤的保护、抗惊厥、镇静催眠等作用^[1],同时亦具有较高的营养价值与保健功效,在民间有很多种做法,常用于保健食疗^[2]。川芎、天麻配合使用,即可作为治疗偏头痛的经典中药复方,同时又是制备保健食品的常用配对原料^[3]。由于方中川芎和天麻所含化学成分分子结构、极性等

作者简介:沈伟(1982—),男(汉),讲师,硕士,研究方向:中药化学与中药炮制学。

差异较大,在目前的文献报道中,一般需分别建立定性、定量分析方法。本文建立了大川芎方的 HPLC 指纹图谱分析方法,能简便、快速、准确地进行定性、定量分析,为该方与相应保健食品的质量控制提供了有效手段。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

洋川芎内酯 I 对照品(批号:140226, 纯度 HPLC≥98%):成都克洛玛生物科技有限公司;阿魏酸对照品(批号 773-9001):中国药品生物制品检定所;天麻素对照品(批号 110807-200205):中国药品生物

制品检定所;川芎药材经山东中医药高等专科学校中药鉴定教研室张钦德教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎;购于上海泰坤堂中医院(产地云南,批号 20121028);天麻药材经山东中医药高等专科学校中药鉴定教研室张钦德教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎;购于上海泰坤堂中医院(产地云南,批号 20121028)。

甲醇:色谱级,美国天地(TEDIA)试剂公司;其余试剂为分析纯。

1.2 仪器

SHIMADZU 高效液相色谱仪(LC-2010A HT),配备 DAD 二极管阵列检测器、四元泵、自动进样器、LC-solution 色谱工作站;TU-1900 紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS2 C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-1%醋酸,按表 1 程序梯度洗脱;柱温:30 °C;流速:1 mL/min。

表 1 流动相梯度洗脱变化程序

Table 1 The gradient elution procedure

时间/min	甲醇/%	1%冰醋酸/%
0	5	95
35	35	65
50	80	20
60	80	20
65	5	95

1.3.2 供试品溶液的制备

1.3.2.1 川芎效应组分的制备方法

川芎粗粉,分别加 12 倍量、10 倍量、8 倍量 70% 乙醇,回流提取 3 次(1.5、1、0.5 h),滤过,合并滤液,减压回收乙醇,真空干燥,得川芎效应组分干浸膏。

1.3.2.2 天麻效应组分的制备方法

天麻粗粉,加 10 倍量 70% 乙醇,回流提取 2 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,减压回收乙醇,真空干燥,得天麻效应组分干浸膏。

1.3.2.3 大川芎方供试品溶液的制备方法

称取川芎、天麻干浸膏(生药量 4:1)于 25 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,超声溶解 10 min,经 0.45 μm 有机相微孔滤膜滤过,即得 60 mg/mL 的大川芎方供试品溶液。

1.3.2.4 阿魏酸对照品溶液的制备方法

精密称取 FA 对照品 4.6 mg 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容,即得 46 μg/mL 的 FA 对照品溶液。

1.3.2.5 天麻素对照品溶液的制备方法

精密称取 GS 对照品 3.0 mg 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容,即得 30 μg/mL 的 GS 对照品溶液。

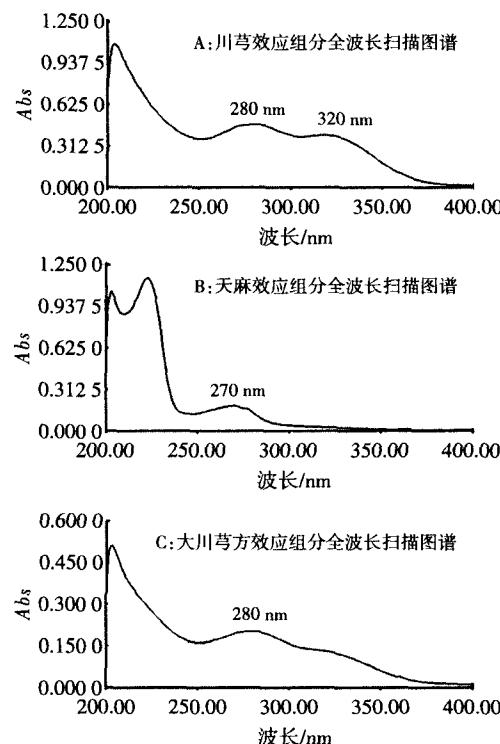
1.3.2.6 洋川芎内酯 I 对照品溶液的制备方法

精密称取 SI 对照品 14.8 mg 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,得 1.48 mg/mL 的 SI 对照品储备液。精密量取 1 mL 储备液于 100 mL 容量瓶中,甲醇定容至刻度,即得 14.8 μg/mL 的 SI 对照品溶液。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

精密量取川芎、天麻效应组分干浸膏,分别置 100 mL 容量瓶中,另取 100 mL 容量瓶,按川芎、天麻生药量 4:1 的比例称取干浸膏,均加甲醇稀释至刻度,超声溶解。精密吸取一定量的川芎效应组分溶液、天麻效应组分溶液和大川芎方效应组分溶液,转移置 100 mL 容量瓶中,制成 0.4 mg/mL 的川芎供试品、1.0 mg/mL 的天麻供试品和 3.0 mg/mL 的大川芎方供试品,以甲醇为空白,在 200 nm~400 nm 波长范围内进行扫描。结果见图 1。



A 为川芎效应组分;B 为天麻效应组分;C 为大川芎方效应组分。

图 1 全波长扫描图

Fig.1 Full-wavelength scan diagram

根据紫外扫描结果可知,川芎效应组分在 280 nm 和 320 nm 波长下均有较稳定的吸收。天麻效应组分在

270 nm 波长下有较稳定的吸收。大川芎方效应组分在 280 nm 波长下有较稳定的吸收。

本试验重点考查了大川芎方效应组分 270、280、320 nm 检测波长下的色谱图,见图 2。

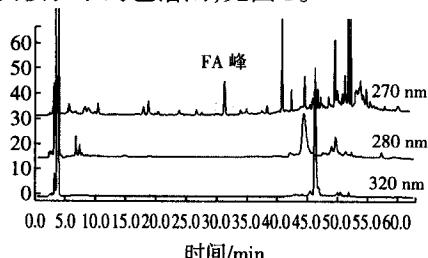


图 2 大川芎方 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC fingerprint diagram of Dachuanxiong formula

结果表明:270 nm 色谱图各色谱峰的响应值较高,出峰数目多,故检测波长定为 270 nm。

2.2 参照物的选择

FA 对照品、GS 对照品、SI 对照品的色谱图见图3。



图 3 对照品色谱图

Fig.3 Chromatogram of three reference substances

其中保留时间为 31.1 min 的 FA 色谱峰(见图 3,3 号峰)是 HPLC 图谱中峰面积较大、出峰时间适中且很稳定的色谱峰,选择该峰作为参照。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验

取同一批次大川芎方效应组分干浸膏,制备供试品溶液,连续进样 6 次,测定。结果:各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 $RSD < 5\%$,表明仪器精密度良好。

2.3.2 重现性试验

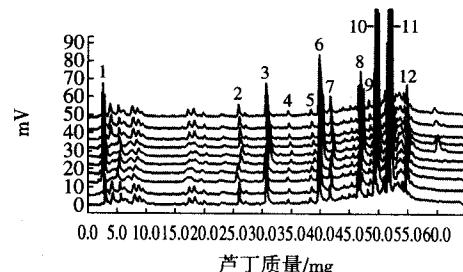
取同一批次大川芎方效应组分干浸膏,平行制备 6 份供试品溶液,测定。结果:各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 $RSD < 5\%$,表明方法重现性良好。

2.3.3 稳定性试验

取同一批次大川芎方效应组分干浸膏,制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12 h 进样分析,测定。结果:各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 $RSD < 5\%$,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4 指纹图谱的测定及结果

制备 10 批川芎、天麻效应组分干浸膏,并按供试品溶液制备方法平行制备 10 份供试品溶液,测定 HPLC 色谱图,记录 65 min 的色谱图谱,结果见图 4。



1 号峰为 GS 峰;3 号峰为 FA 峰;6 号峰为 SI 峰

图 4 大川芎方效应组分 10 批样品指纹图谱

Fig.4 HPLC fingerprints of 10 batch samples of Dachuanxiong formula effective extracts

经与图 3 对照品色谱图比较得知,1 号峰为 GS 峰,3 号峰为 FA 峰,6 号峰为 SI 峰。以 FA 色谱峰的保留时间和峰面积的积分值为 1,计算各共有峰的相对保留时间和峰面积比,其值 $RSD < 5\%$ 。结果表明,所建立的指纹图谱分析方法有较好的重现性及稳定性,可用于大川芎方的定性、定量分析。

3 讨论

以往的大川芎方研究者常以其中的一到两种主要成分(FA、GS)作为研究指标,但川芎、天麻所含化学成分较为复杂,仅以一到两种成分为指标进行研究显然无法体现该方的整体作用特点,故建立大川芎方化学成分的指纹图谱是十分必要的。本文所建立的大川芎方效应组分 HPLC 指纹图谱测定方法,方法学研究表明所建立的方法准确、稳定、简便易行,色谱图中色谱峰最为丰富,能相对全面的反映出大川芎方中所含的复杂化学成分体系,不仅可以用于大川芎方、大川芎方制剂或川芎、天麻药对药膳、保健食品物质基础的探究,也可以为该方及相应保健食品的质量控制提供强有力的技术手段。

参考文献:

- [1] W Liu, B L Su, Z S Wang, et al. Gastrodin Improved Baroreflex Sensitivity and Increased Gamma -Amino Butyric Acid Content in Brains without Decreasing Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18:873-875
- [2] 赵杨,康志娇,周欣,等.药食两用植物-天麻[J].贵州师范大学学报(自然科学版),2013,31(4):9-12
- [3] L Wang, J Zhang, Y Hong, et al. Phytochemical and Pharmacological Review of Da Chuanxiong Formula: A Famous Herb Pair Composed of Chuanxiong Rhizoma and Gastrodiae Rhizoma for Headache[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013,2013:42,53,69